



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

PCT/EP 02 / 14 802  
Rec'd PCT/ATC 28 JUN 2004

30 DEC 2002

REC'D 28 MAR 2003

PO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

01830834.6

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Anmeldung Nr:  
Application no.: 01830834.6  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 28.12.01  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Leone, Arturo  
Via Domenico Fontana, 134/4  
80128 Napoli  
ITALIE  
Turco, Maria Caterina  
Via Errico, 37  
83100 Avellino  
ITALIE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C07K14/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

**TITOLO**

Sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di BAG3 da impiegare in ricerca, diagnosi e terapia per patologie che coinvolgono la morte cellulare, e per la modulazione della sopravvivenza e/o morte cellulare.

\*\*\*\*\*

**Campo dell' invenzione**

La presente invenzione si riferisce a sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di BAG3 da impiegare in terapia, diagnosi e ricerca, di per patologie che coinvolgono la morte cellulare, e per la modulazione della sopravvivenza e/o morte cellulare.

In particolare, l' invenzione si riferisce all' uso di tali sequenze o loro parti in leucemie, altre neoplasie e patologie che coinvolgono la morte cellulare.

**Background**

La morte cellulare per apoptosi è largamente responsabile del controllo dell' omeostasi tissutale e dei processi differenziativi ed immunitari. Alterazioni del programma di apoptosi sono implicate in danni tissutali acuti e cronici (ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, malattie croniche degenerative come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre, ecc.), caratterizzate da eccessiva apoptosi, e malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di altro tipo che coinvolgono una apoptosi deficitaria. Inoltre, poiché i composti antineoplastici agiscono principalmente inducendo apoptosi nelle cellule cancerose, le molecole coinvolte nella risposta apoptotica determinano la sensibilità o la resistenza delle cellule neoplastiche alla terapia. Componenti biochimiche e/o regolatori delle vie apoptotiche possono costituire bersagli di terapie modulanti, alcune delle quali hanno mostrato efficacia in modelli preclinici e sono ora in ptotocolli clinici sperimentali nell' uomo. Inoltre, molecole coinvolte nell' apoptosi possono rappresentare strumenti diagnostici in una gamma di malattie e reagenti per il lavoro di laboratorio (1).

BAG3 è un membro della famiglia di proteine BAG, coinvolte in attività di co-chaperone per il ripiegamento di proteine (2). Benché BAG3 mostri omologia con gli altri membri della famiglia BAG in alcune porzioni, come il dominio BAG, altre parti delle sue sequenze nucleotidica ed aminoacidica sono uniche (2-4). Tali porzioni uniche, specifiche di BAG3, sono state individuate e utilizzate per l'invenzione qui descritta.

La proteina BAG3 è nota essere espressa in alcune linee cellulari, come HeLa e A2058, e, per quanto riguarda cellule umane primarie normali, nel muscolo scheletrico, nel cuore, nell'ovaio ed in altri tipi di cellule normali (2-5). L'espressione di BAG3 è stata rilevata anche in cellule tumorali pancreatiche umane (6).

L'espressione di BAG3 non è stata finora riportata in altri tipi di cellule primarie normali o neoplastiche.

Alcuni risultati descrivono che la trasfezione di cellule della linea cellulare umana HeLa (5) o della linea cellulare murina 32D (7) con costrutti iperesprimenti BAG3 può incrementare modestamente l'apoptosi cellulare indotta da microiniezione di Bax via Fas (5), o da privazione di IL-3 (7), rispettivamente.

Prima dei risultati qui riportati per la prima volta, non era noto che l'espressione di BAG3 influenzasse l'apoptosi in cellule primarie, normali, neoplastiche o affette da altri tipi di patologie. Inoltre, la modulazione negativa di BAG3 con reagenti, quali oligonucleotidi, che possono essere usati in cellule primarie, ed i suoi effetti sull'apoptosi non erano mai stati riportati. Come non erano mai stati descritti anticorpi monoclonali specifici per BAG3.

#### Riassunto dell'invenzione.

La presente invenzione si riferisce alla proteina BAG3 (SEQ. ID. N. 2), alle corrispondenti sequenze nucleotidiche (SEQ. ID. N. 1), e alle relative porzioni (indicate con una sottolineatura all'interno delle sequenze complete).

Costituisce pertanto oggetto dell' invenzione l' uso della proteina BAG3, dei corrispondenti polinucleotidi codificanti per essa e relative porzioni, in ricerca, terapia e diagnosi nel campo della modulazione della sopravvivenza e/o morte di cellule primarie, in particolare nelle leucemie ed altre neoplasie o malattie che coinvolgano la morte cellulare.

Rientrano nell'ambito dell'invenzione in quanto correlati a BAG3: oligo per PCR; sequenze nucleotidiche per analisi di DNA o RNA; la proteina o sue porzioni e le sequenze nucleotidiche che per esse codificano, incluse molecole di DNA ricombinante, geni clonati o loro varianti degenerate, specialmente varianti naturali come quelle alleliche; oligonucleotidi senso o antisenso; anticorpi monoclonali o policlonali che riconoscano specificamente uno o più epitopi specifici di BAG3.

Reagenti e composizioni per gli usi descritti nella presente invenzione includono inoltre vettori, quali vettori di espressione, virus, ecc., contenenti sequenze specifiche di BAG3; cellule ingegnerizzate geneticamente per contenere tali sequenze e cellule ingegnerizzate geneticamente per esprimere tali sequenze. I reagenti includono inoltre i complementari di qualsiasi delle sequenze nucleotidiche suddette.

Le composizioni per gli usi descritti nella presente invenzione possono inoltre comprendere un carrier accettabile, come un carrier farmaceuticamente accettabile.

Gli usi di BAG3 descritti nella presente invenzione includono anche metodi per prevenire, trattare o migliorare una condizione clinica, il che comprende il somministrare ad un essere umano o ad un altro animale una quantità terapeuticamente efficace di una composizione che comprenda reagenti basati su BAG3. Esempi sono metodi per prevenire, trattare o migliorare: danni tissutali acuti o cronici, come ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, danni cerebrali o di altri tessuti in relazione a HIV, malattie muscolari scheletriche, rigetto di trapianti; malattie degenerative croniche come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre; malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di

altro tipo che coinvolgano un' apoptosi eccessiva o deficitaria; riparo di tessuti o rimarginazione di ferite, trattamento di incisioni chirurgiche, ed ulcere, come ulcere gastriche o diabetiche; ecc.

Gli usi basati su BAG3 descritti nella presente invenzione sono relativi anche a reagenti e metodi per rilevare la presenza della sequenza nucleotidica di BAG3 o della proteina o di parti di esse. Tali metodi possono, ad esempio, essere utilizzati come parte di valutazioni diagnostiche e/o prognostiche di malattie sopra dette e per l' identificazione di soggetti che abbiano una predisposizione a tali condizioni. Inoltre, l' invenzione include gli usi relativi a BAG3 per valutare l' efficacia di farmaci, e monitorare lo stato di pazienti, soggetti a protocolli clinici per il trattamento di malattie sopra dette.

Gli usi relativi a BAG3 della presente invenzione includono anche reagenti e/o metodi per l' identificazione di composti che modulino l' espressione o l' attività di BAG3. Tali reagenti o metodi possono essere utilizzati, ad esempio, per l' identificazione di composti che possano migliorare i sintomi di malattie sopra dette. Tali metodi includono, ma non sono limitati a, saggi per identificare composti o altre sostanze che interagiscano con (cioè, leghino) la proteina o la sequenza nucleotidica di BAG3 o parti di esse.

L' invenzione include anche metodi per trattamenti terapeutici che possano coinvolgere la somministrazione di tali preparati ad individui che mostrino sintomi o tendenze correlati alle malattie sopra dette. In aggiunta, l' invenzione comprende metodi per il trattamento di malattie o disordini attraverso la somministrazione di composti o altre sostanze che modulino l' attività di BAG3 e molecole correlate. Composti ed altre sostanze possono effettuare tale modulazione a livello dell' espressione genica o della proteina.

Preparati per diagnosi, prognosi o terapia per gli usi relativi a BAG3 collegati alla presente invenzione possono anche riguardare applicazioni

in veterinaria. Particolarmente animali domestici e cavalli di razza, oltre agli esseri umani, sono possibili pazienti per tali applicazioni.

Gli usi di BAG3 descritti nella presente invenzione includono anche reagenti e/o metodi e/o kits per attività di laboratorio e/o di ricerca.

Ulteriori oggetti dell' invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata dell' invenzione.

#### Breve descrizione delle figure

Fig. 1 mostra l' espressione del mRNA (pannello A) e della proteina (pannello B) BAG3 in cellule primarie di pazienti leucemici.

Fig. 2 mostra la capacità di modulare negativamente BAG3 di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in cellule primarie di pazienti leucemici.

Fig. 3 mostra la stimolazione del rilascio del citocromo c mitocondriale da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in cellule primarie di pazienti leucemici.

Fig. 4 mostra la stimolazione dell' attività caspasica da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in cellule primarie di pazienti leucemici.

Fig. 5 mostra l' incremento del legame all' annessina V da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in cellule primarie di pazienti leucemici.

Fig. 6 mostra la stimolazione dell' apoptosi in cellule primarie di B-CLL (leucemia linfocitica cronica B) da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3.

Fig. 7 mostra la stimolazione dell' apoptosi in cellule primarie di ALL (leucemia linfoblastica acuta) da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3.

Fig. 8 mostra la capacità di modulare negativamente BAG3 di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in cellule umane U937.

Fig. 9 mostra la stimolazione dell' apoptosi indotta da stress in cellule della linea umana mieloide U937 da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3.

Fig. 10 mostra la stimolazione dell' apoptosi indotta da stress in linfociti (pannello A) o monociti (pannello B) umani normali primari da sangue periferico da parte di oligonucleotidi antisenso di BAG3.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL' INVENZIONE

Si riportano appresso la sequenza peptidica e amminoacidica di BAG.3, le parti sottolineate sono relative alle porzioni di particolare interesse per gli scopi dell'invenzione. Si intendono comunque ricomprese nell'invenzione anche porzioni delle sequenze indicate.

Sequenza nucleotidica di BAG3 (SEQ. ID. N. 1):

referimento: NCBI PubMed, XM\_055575

Homo sapiens BCL2-associated athanogene 3 (BAG3), mRNA  
gi|16156810|ref|XM\_055575.1||16156810]

```

1   g c g g a g c t c c   g c a t c c a a c c   c c g g g c c g c g   g c c a a c t t t t
    t t g g a c t g g a   c c a g a a g t t t
-   c t a g c c g g c c   a g t t g c t a c c   t c c t t t a t c   t c t c c t t c c
    c c t c t g g c a g   c g a g g a g g c t
121 a t t t c c a g a c   a c t t c c a c c c   c t c t c t g g c c   a c g t c a c c c c
    c g c c t t t a a t   t c a t a a a g g t
181 g c c c g g c g c c   g g c t t c c c g g   a c a c g t c g g c   g g c g g a g a g g
    g g c c c a c g g c   g g c g g c c c g g
241 c c a g a g a c t c   g g c g c c c g g a   g c c a g c g c c c   c g c a c c c g c g
    c c c c a g c g g g   c a g a c c c c a a
301 c c c a g c a t g a   g c g c c g c c a c   c c a c t c g c c c   a t g a t g c a g g
    t g g c g t c c g g   c a a c g g t g a c
361 c g c g a c c e t t   t g c c c c c c g g   a t g g g a g a t c   a a g a t c g a c c
    c g c a g a c c g g   c t g g c c e t t c
421 t t c g t g g a c c   a c a a c a g c c g   c a c c a c t a c g   t g g a a c g a c c
    c g c g c g t g c c   c t c t g a g g g c
481 c c c a a g g a g a   c t c c a t c c t c   t g c c a a t g g c   c c t t c c c g g g
    a g g g c t c t a g   g c t g c c g c c t
541 g c t a g g g a a g   g c c a c c c t g t   g t a c c c c c a g   c t c c g a c c a g
    g c t a c a t t c c   c a t t c c t g t g
601 c t c c a t g a a g   g c g c t g a g a a   c c g g c a g g t g   c a c c t t t t c c
    a t g t c t a t c c   c c a g c c t g g g
661 a t g c a g c g a t   t c c g a a c t g a   g g c g g c a g c a   g c g g c t c c t c
    a g a g g t c c c a   g t c a c c t c t g

```



721 cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg  
gacaggtggc agcggcggcg  
 781 gcagcccagc cccagcctc ccacggacct gagcgggtccc  
agtctccagc tgcctctgac  
 841 tgctcatcct catcctcctc ggccagcctg ccttcctccg  
gcaggagcag cctgggcagt  
 901 caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac  
acgagcagaa cgttaccggg  
 961 ccagcagccc agccctcctt ccaccaagcc cagaagacgc  
actaccagc gcagcagggg  
 1021 gagtaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg  
gggatgactg ggagccccgg  
 1081 cccctgcggg cggcatcccc gttcagggtca tctgtccagg  
gtgcatcgag ccgggagggc  
 1141 tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctcgc  
ccatccgtgt gcacaccgtg  
 1201 gtcgacaggc ctcagcagcc catgacccat cgagaaactg  
cacctgtttc ccagcctgaa  
 1261 aacaaaccag aaagtaagcc agggccagtt ggaccagaac  
tccctcctgg acacatcca  
 1321 attcaagtga tccgcaaaga ggtggattct aaacctgttt  
cccagaagcc cccacctcc  
tctgagaagg tagaggtgaa agttccccct gctccagttc  
cttgtcctcc tcccagccct  
 1441 ggcccttctg ctgtcccctc ttcccccaag agtgtggcta  
cagaagagag ggcagcccc  
 1501 agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca aaaccaggag  
aagccgaggc tcccccaaaa  
 1561 catccaggag tgctgaaagt ggaagccatc ctggagaagg  
tgacggggct ggagcaggct  
 1621 gtagacaact ttgaaggcaa gaagactgac aaaaagtacc  
tgatgatcga agagtatttg  
 1681 accaaagagc tgctggccct ggattcagtg gaccccgagg  
gacgagccga tgtgcgtcag  
 1741 gccaggagag acggtgtcag gaaggttcag accatcttgg  
aaaaacttga acagaaagcc  
 1801 attgatgtcc caggtcaagt ccaggtctat gaactccagc  
ccagcaacct tgaagcagat  
 1861 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag  
cagacaaggg caagaaaaat  
 1921 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc  
cagaagccac agcagcagcg  
 1981 acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc  
cagcagcacc gtagcctctg  
 2041 ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgctttagg  
gaattttaag ttgcatgcat

2101 ttcagagact ttaagtcagt tggtttttat tagctgcttg  
gtatgcagta acttgggtgg  
2161 aggcaaaaca ctaataaaag ggctaaaaag gaaaatgatg  
cttttcttct atattcttac  
2221 tctgtacaaa taaagaagtt gcttgttggt tcagaagttt  
aaccccgttg cttgttctgc  
2281 agccctgtct acttgggcac cccaccacc tgtagctgt  
ggttggtgcac tgtctttgt  
2341 agctctggac tggaggggta gatggggagt caattacca  
tcacataaat atgaaacatt  
2401 tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca  
tctcataatt aaaatacctg  
2461 actttagaga gagtaaaatg tgccaggagc cataggaata  
tctgtatggt ggatgacttt  
2521aatgctacat ttt

Sequenza aminoacidica di BAG3 (SEQ. ID. N. 2):

riferimento: NCBI PubMed, XM\_055575

Homo sapiens BCL2-associated athanogene 3 (BAG3), mRNA  
gi|16156810|ref|XM\_055575.1|[16156810]

"MSAATHSPMMQVASGNDRDPLPPGWEIKIDPQTGWPFVVDHNS

RTTTWNDPRVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPIPI  
VLHEG

AENRQVHPFHVYPQPGMQRFERTEAAAAAPQRSQSPLRGMPEOTTOQDKQCGOVA  
AAAAA

QPPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPSSGRSSLGSHQLPRGYISIPVIHE  
QNVTR

PAAQPSFHOAQKTHYPAQQGEYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRRSSVQ  
GASSR

EGSPARSSTPLHSPSPIRVHTVVDRPQQPMTHRETAPVSQENKPEKPGPVG  
PELPP

GHIPIQVIRKEVDSKPVSKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPSAVPSSP  
KSVAT

EERAAPSTAPAEATPPKPGAEAPPKHGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGK  
KTDKK

YLMIEEYLTKEALLDSVDPEGRADVRRQARRDGVRKVQTILEKLEQKAIDVPG  
QVQVY

ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEATAAATSN  
PSSMT

DTPGNPAAP"

I frammenti polinucleotidici e aminoacidici corrispondenti alle SEQ. ID. N.

1 e 2 sono indicati appresso:

SEQ. ID. N. 10:

gcgagctcc gcatccaacc cggggccgcg gccaaacttt ttggactgga ccagaagttt  
ctagccggcc agttgctacc tccctttatc tctctctcc cctctggcag cgaggaggct  
atttcagac acttccacc cctctggcc acgtacccc cgctttaat tcataaaggt  
gcccggcgcc ggcttcccgg acacgtcggc ggcgagagg ggcccacggc  
ggcgcccgcc ccagagactc ggcgcccgga gccagcgccc cgcacccgcg  
ccccagcggg cagaccccaa cccagcatga ggcggccac ccactcgccc atgatgcagg  
tggcgccgg caacggtgac

SEQ. ID. N. 11:

MSAATHSPMMQVASGNGDRDPLPPGWEIKIDPQTG

SEQ. ID. N. 12:

gtgcc ctctgagggc cccaaggaga ctccatctc tgccaatggc ccttcccggg  
agggctctag gctgccgct gctaggaag gccaccctgt gtaccccag ctccgaccag  
gctacattcc cattcctgt ctccatgaag gcgctgagaa ccggcagggtg cacccttcc  
atgtctatcc ccagcctggg atgcagcgt tccgaactga ggcggcagca gcggctctc  
agagggtcca gtcacctctg cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg  
gacagggtgc agcgcgggcg gcagccagc cccagcctc ccacggacct gagcggtccc  
agtctccagc tgctctgac tgctatcct catctctc ggccagcctg ccttctccg  
gcaggagcag cctgggcagt caccagctcc cggggggta catctccatt ccggtgatac  
acgagcagaa cgttaccgg ccagcagccc agccctctt ccaccaagcc cagaagacgc  
actaccagc gcagcagggg gtagaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg  
gggatgactg ggagccccgg cccctgcggg cggcatccc gttaggtca tctgtccagg  
gtgcatcgag ccgggagggc tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctgc  
ccatccgtgt gcacaccgtg gtgcacaggc ctgcagcagcc catgacccat cgagaaactg  
cacctgttcc ccagcctgaa aacaaaccag aaagtaagcc aggccagtt ggaccagaac  
tccctcctgg acacatccca attcaagtga tccgcaaaga ggtggattct aaacctgtt  
cccagaagcc cccacctccc tctgagaagg tagaggtagaa agtccccct gctccagttc  
ctgtctctc tccagccct ggccctctg ctgtccctc tcccccaag agtgtggcta  
cagaagagag ggcagcccc agcactgcc ctgcagaagc tacacctcca  
aaaccaggag aagccgaggc tccccaaaa catccaggag

SEQ. ID. N. 13:

NDPRVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPI  
VLHEGAENRQVHPFHVYPQPGMQRFRTEAAAAAPQRSQSPLRGMPE  
TTQPDQKCGQVAAAAAQPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPS  
SGRSSLGSHQLPRGYISIPVIHEQNVTRPAAQPSFHQAQKTHYPAQQG  
EYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRSSVQGASSREGSPARSST

PLHSPSPIRVHTVVDRPQQPMTTHRETAPVSQPENKPESKPGPVGPEL  
 PPGHIPIQVIRKEVDSKPVVSQKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPS  
 AVPSSPKSVATEERAAPSTAPAEATPPKPGAEAEAPPKHPGVLKVEAILE  
 KVQGLEQAVDNFEG

**SEQ. ID. N. 14**

attgatgtcc cagggtcaagt ccagggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat  
 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat  
 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac  
 agcagcagcg acttcaaac ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc cagcagcacc  
 gtagcctcig ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgctttagg gaattttaag  
 ttgatgcat ttacagagact ttaagtcagt tggttttat tagctgcttg gtatgcagta acttgggtgg  
 aggcaaaaaca ctaataaaaag ggctaaaaaag gaaaatgatg ctttcttct atattcttac  
 tctgtacaaa taaagaagtt gcttggttgtt tcagaagttt  
 aaccccggtg cttgttctgc  
 agccctgtct acttgggcac ccccaaccacc tgtagctgt.  
 ggttggtgcac tgtcttttgt  
 agctctggac tggaggggta gatggggagt caattacca  
 tcacataaat atgaaacatt  
 tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca  
 tctcataatt aaaatacctg  
 acttttagaga gagtaaaatg tgccaggagc cataggaata  
 tctgtatggtt ggaatgacttt  
 aatgctacat ttt

**SEQ. ID. N. 15:**

ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEAT  
 AAATSNPSSMTDTPGNPAAP

Abbiamo analizzato per PCR l'espressione del mRNA di BAG3 in cellule primarie da pazienti con B-CLL. Il mRNA di BAG3 era rilevabile in tali cellule, ed i suoi livelli apparivano aumentati dal trattamento con il chemioterapico fludarabina fosfato (fig. 1, pannello A). Inoltre abbiamo ottenuto un anticorpo policlonale di coniglio contro il peptide sintetico NPSSMTDTPGNPAAP<sub>COOH</sub> (SEQ. ID. N. 3), corrispondente agli ultimi 15 aminoacidi della regione carbossiterminale della proteina BAG3; Con tale anticorpo BAG3- specifico abbiamo analizzato per immunofluorescenza l'espressione della proteina BAG3, che era rilevabile in cellule primarie di B-CLL ed i cui livelli apparivano aumentati dal trattamento con fludarabina (fig. 1, pannello B). In una complessiva analisi su 18 campioni di B-CLL, 13 mostravano livelli rilevabili della

proteina BAG3, ed in 11 di questi tali livelli venivano aumentati dal trattamento con fludarabina.

Questi risultati dimostrano per la prima volta che l'espressione di BAG3 è rilevabile in cellule leucemiche primarie e modulata da terapia. Tali risultati forniscono un uso diagnostico e/o prognostico, mai rivelato prima, di reagenti basati su BAG3 nelle leucemie.

Per modulare l'espressione di BAG3, abbiamo costruito oligonucleotidi antisenso:

antisenso 1: TGCATCATGG GCGAGTGGGT GGCGG (SEQ. ID. N. 4),

antisenso 2: GCTCATGCTG GGTTGGGGTC TG (SEQ. ID. N. 5),

antisenso 3: ATTAAAGGCG GGGGTGACGT GG (SEQ. ID. N. 6),

e nonsense di controllo:

nonsense 1: TTATATTCTATTATATTTATGAACTCC (SEQ. ID. N. 7),

nonsense 2: CCTCGTAACCACCG ACCTCAAT (SEQ. ID. N. 8),

nonsense 3: GCTTATGGAG GATTGAGGTT GG (SEQ. ID. N. 9).

Altri oligo si possono costruire, analoghi funzionalmente a quelli indicati, in particolare gli oligo si possono costruire sulla base delle sequenze indicate con SEQ. ID. N. 10, 12, 14.

La somministrazione degli oligo antisenso, ma non di quelli nonsense, a cellule leucemiche umane primarie ex vivo produceva una modulazione negativa dei livelli della proteina BAG3. Risultati rappresentativi sono mostrati in fig.2; risultati analoghi sono stati ottenuti con tre differenti campioni di B-CLL. Questi risultati forniscono un uso, non mostrato prima, di oligonucleotidi antisenso per BAG3 per modulare i livelli della proteina BAG3 in cellule primarie (in questo caso neoplastiche, e specificamente leucemiche).

Abbiamo quindi analizzato se gli oligonucleotidi antisenso, modulando i livelli della proteina BAG3, influenzassero l'apoptosi. Cellule primarie da pazienti leucemici sono state incubate con o senza oligonucleotidi antisenso o di controllo e/o fludarabina, e sono stati analizzati differenti eventi dell'apoptosi: rilascio del citocromo c mitocondriale (8),

attivazione della caspasi 3 (9), legame dell' annessina V (10) e comparsa di elementi ipodiploidi (11). Un' analisi complessiva su 15 campioni di B-CLL mostrava che la somministrazione di oligo antisenso, ma non di oligo di controllo, alle cellule produceva la stimolazione del rilascio del citocromo c mitocondriale (fig. 3), dell' attività caspasica (fig. 4), del legame dell' annessina V (fig. 5) e della comparsa di elementi ipodiploidi (fig. 6). La stimolazione dell' apoptosi era ulteriormente amplificata dall' aggiunta di fludarabina (fig. 6). Inoltre, in 4 su 4 campioni di ALL analizzati, l' effetto pro-apoptotico degli oligo antisenso usati da soli era particolarmente notevole, poiché la percentuale di elementi ipodiploidi raggiungeva >60% (simile al valore ottenuto con il composto chemioterapico AraC) (fig. 7).

Perciò noi dimostriamo per la prima volta che la modulazione negativa dei livelli di proteina BAG3 attraverso la somministrazione di oligonucleotidi antisenso di BAG3 in diversi tipi di cellule primarie di leucemia umana può stimolare l' apoptosi. L' effetto pro-apoptotico è notevole quando gli oligo vengono somministrati da soli e può essere sinergico con quello di differenti chemioterapici.

Questi risultati forniscono la possibilità di uso, mai mostrato prima, di reagenti che modulano BAG3, come oligonucleotidi antisenso, di modulare la sopravvivenza e/o la morte in cellule umane primarie, in questo caso neoplastiche, e specificamente leucemiche. Essi indicano anche il possibile uso di tali reagenti in sinergia con altri farmaci.

Ulteriori risultati sono stati ottenuti usando cellule umane di tipi differenti: cellule di osteosarcoma della linea SAOS, in cui abbiamo rilevato un marcato effetto pro-apoptotico degli oligonucleotidi antisenso usati da soli (tabella 1); e cellule mieloidi della linea U937, in cui gli antisenso di BAG3 potevano aumentare l' apoptosi indotta da stress (fig. 9). In particolare, l' aumento dell' apoptosi indotta da stress in cellule U937 ci ha suggerito di verificare se reagenti basati su BAG3 potessero interferire anche con gli effetti dello stress in cellule umane primarie.

Perciò abbiamo somministrato oligo antisenso o di controllo a linfociti o monociti umani normali ex vivo da sangue periferico, trattati con gli induttori di stress dietilmaleato (DEM) e 2-metossimetilestradiolo (2-ME). Oligo antisenso, ma non di controllo, amplificavano altamente l'apoptosi in queste cellule (fig. 10). Questi risultati dimostrano per la prima volta che gli effetti dello stress su cellule umane primarie (in questo caso, cellule normali, e specificamente linfociti e monociti del sangue periferico) possono essere modulati da reagenti basati su BAG3.

Abbiamo analizzato se con reagenti basati su BAG3 si potesse ottenere protezione dalla morte cellulare. Perciò abbiamo trasfettato cellule della linea 293 con un costrutto iperesprimente BAG3 ed abbiamo verificato gli effetti sull'apoptosi indotta da stress. La trasfezione con il costrutto BAG3 produceva una protezione dall'apoptosi indotta da stress (tabella 2).

Infine, attraverso procedure standard, già messe in pratica nel nostro laboratorio (12), abbiamo prodotto un anticorpo monoclonale murino, chiamato AC-1. Questo è specifico per la proteina BAG3.

Con riferimento agli scopi della presente invenzione, la proteina BAG3, il corrispondente polinucleotide, relative porzioni polipeptidiche e polinucleotidiche e gli oligonucleotidi antisenso possono essere impiegati per scopi di ricerca, diagnosi e terapia per affezioni quali le leucemie e per altre neoplasie e malattie che coinvolgono la morte cellulare, e per la modulazione della sopravvivenza e/o morte cellulare. I reagenti basati su BAG3 includono in maniera non limitativa: oligonucleotidi, innesicatori per reazioni polimerasiche, sonde, (poli)peptidi o proteina, anticorpi monoclonali o policlonali, ecc., e qualsiasi altro reagente capace di rilevare o modulare l'espressione di BAG3.

Si intendono ricompresi nella presente invenzione i reagenti equivalenti a quelli indicati, che permettono di ottenere risultati simili a quelli illustrati nella presente invenzione.

In particolare, per quanto riguarda la proteina o sue parti o peptidi, sono considerati equivalenti:

- (poli)peptidi o proteine naturali, che siano (poli)peptidi o proteine prodotti da cellule che non sono state ingegnerizzate geneticamente e specificamente contempla vari (poli)peptidi o proteine che vengano da modificazioni post-trascrizionali o post-traduzionali del (poli)peptide o della proteina incluse, ma non limitatamente a, acetilazione, carbossilazione, glicosilazione, fosforilazione, lipidazione ed acilazione;
- derivati, che siano (poli)peptidi o proteine chimicamente modificati con tecniche quali ubiquitinazione, marcatura (ad esempio, con radionuclidi, fluorocromi o vari enzimi), PEGilazione (formazione di derivati con glicol polietilenico) ed inserzione o sostituzione per sintesi chimica di aminoacidi come l' ornitina, che non si ha normalmente nelle proteine umane;
- varianti ricombinanti, che siano (poli)peptidi o proteine che differiscano da (poli)peptidi o proteine naturali per inserzione di aminoacidi, delezioni, sostituzioni, create usando tecniche di DNA ricombinante. Un criterio per determinare quali residui aminoacidici possano essere sostituiti, aggiunti o deleti senza abolire attività di interesse, come il traffico cellulare, può essere rinvenuto comparando la sequenza del particolare polipeptide con quella dei peptidi omologhi e minimizzando il numero di cambiamenti nella sequenza aminoacidica fatti in regioni di alta omologia.

Preferibilmente, le sostituzioni aminoacidiche sono il risultato della sostituzione di un aminoacido con un altro aminoacido che abbia proprietà strutturali e/o chimiche simili, cioè sostituzioni aminoacidiche conservative. Sostituzioni di aminoacidi possono essere fatte sulla base di similarità in polarità, carica, solubilità, idrofobicità, idrofilicità, e/o la natura anfipatica dei residui coinvolti. Per esempio, gli aminoacidi non polari (idrofobici) includono alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina,



fenilalanina, triptofano e metionina; gli aminoacidi polari neutri includono glicina, serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina e glutamina; gli aminoacidi positivamente carichi (basici) includono arginina, lisina ed istidina; gli aminoacidi carichi negativamente (acidici) includono l'acido aspartico e l'acido glutammico. La variazione consentita può essere determinata sperimentalmente facendo inserzioni, delezioni o sostituzioni aminoacidiche sistematiche in una molecola polipeptidica usando tecniche di DNA ricombinante ed analizzando le varianti ricombinanti che ne risultano per la loro attività.

Alternativamente, ove si desideri un'alterazione della funzione, inserzioni, delezioni o alterazioni non conservative possono essere ingegnerizzate per produrre (poli)peptidi o proteine alterati. Tali alterazioni possono, per esempio, alterare una o più funzioni biologiche o caratteristiche biochimiche. Per esempio, tali alterazioni possono cambiare caratteristiche del (poli)peptide o della proteina quali l'affinità per ligandi, affinità intercatena, o grado di degradazione/ricambio. Inoltre, tali alterazioni possono essere selezionate così da generare (poli)peptidi o proteine che siano più adatti per l'espressione, l'efficienza di produzione e l'adattabilità nelle cellule ospiti scelte per l'espressione. Per esempio, i residui di cisteina possono essere deleti o sostituiti con altri residui aminoacidici per eliminare i ponti disolfuro.

Sostanzialmente equivalenti possono essere sequenze nucleotidiche o aminoacidiche, per esempio una sequenza mutata, che vari da una sequenza di riferimento per una o più sostituzioni, delezioni o aggiunte, l'effetto netto delle quali non risulti in una dissimiglianza funzionale fra tale sequenza e quella di riferimento. Tipicamente, una tale sequenza sostanzialmente equivalente varia da quella di riferimento di non più del 20%: cioè, il numero delle sostituzioni, inserzioni e/o delezioni individuali in una sequenza sostanzialmente equivalente, comparata alla corrispondente sequenza di riferimento, diviso per il numero totale dei residui nella sequenza sostanzialmente equivalente dovrebbe dare 0.2 o

meno. Una tale sequenza è detta avere l' 80% di identità con la sequenza di riferimento. Oppure, una sequenza mutata sostanzialmente equivalente a quella/e oggetto dell' invenzione può variare dalla sequenza di riferimento per non più del 10% (90% di identità), del 5% (95% di identità) o del 2% (98% di identità). Rispetto alle sequenze aminoacidiche, le sequenze nucleotidiche sostanzialmente equivalenti a quella/e dell' invenzione possono avere una percentuale più bassa di identità, considerate, ad esempio, la ridondanza o la degenerazione del codice genetico. Per gli scopi della presente invenzione, sequenze che abbiano attività biologica sostanzialmente equivalente e caratteristiche di espressione sostanzialmente equivalenti sono considerate sostanzialmente equivalenti. Va scartata la possibilità di troncare, allo scopo di determinare l' equivalenza, la sequenza matura (ad esempio, attraverso una mutazione che crei un codone di stop spurio).

Sequenze nucleotidiche che codifichino per tali sequenze sostanzialmente equivalenti, sequenze con le percentuali di identità sopra dette possono essere isolate ed identificate attraverso procedure standard di ibridazione ben note agli esperti.

Volendo, si può disegnare un vettore di espressione che contenga una sequenza segnale o leader che dirigerà il polipeptide attraverso la membrana di una cellula. Una tale sequenza può essere presente naturalmente o presa da fonti proteiche eterologhe con tecniche di DNA ricombinante.

Varianti ricombinanti che codifichino questi stessi o simili (poli)peptidi o proteine possono essere sintetizzate o selezionate facendo uso della ridondanza del codice genetico. Varie sostituzioni di codone, come i cambiamenti silenti, che producono vari siti di restrizione, possono essere introdotte per ottimizzare il clonaggio in un plasmide o in un vettore virale o l' espressione in un particolare sistema procariotico o eucariotico. Mutazioni nella sequenza polinucleotidica possono riflettersi nel polipeptide o in domini di altri peptidi aggiunti al polipeptide per

modificare le proprietà di una qualche parte del polipeptide, o caratteristiche quali affinità per i ligandi, affinità intercatena o grado di degradazione/ricambio.

Parti della/e sequenza/e nucleotidica o aminoacidica relativa/e a BAG3 possono essere fuse a molecole carrier quali immunoglobuline o simili per molti scopi, inclusa l' implementazione della valenza di siti proteici leganti.

Reagenti basati su omologhi di specie di BAG3 sono considerati equivalenti rispetto agli usi illustrati nella presente invenzione.

Le sequenze che ricadono nello scopo della presente invenzione non sono solo le specifiche sequenze qui descritte o loro porzioni, ma anche le varianti alleliche.

La presente invenzione viene illustrata dai seguenti esempi, figure e tabelle che non sono da considerarsi limitanti lo scopo dell' invenzione.

#### Descrizione dettagliata delle figure e tabelle

Fig. 1 – Espressione del mRNA e della proteina BAG3 in cellule primarie da pazienti affetti da leucemia. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque (13) e tenute in coltura per 24 ore in mezzo RPMI 1640 supplementato con il 10% di siero bovino fetale (10% FCS-RPMI), con o senza fludarabina fosfato. Pannello A: il mRNA è stato estratto e l' espressione di BAG3 è stata verificata per PCR (l' espressione del GAPDH viene mostrata a scopo di comparazione). Pannello B: le cellule sono state permeabilizzate ed analizzate in immunofluorescenza indiretta con un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il peptide sintetico NPSSMTDTPGNPAAP<sub>COOH</sub>, corrispondente agli ultimi 15 aminoacidi della regione carbossiterminale della proteina BAG3. a= anticorpo di controllo; b= cellule in mezzo di controllo analizzate con anti-BAG3; c=cellule incubate con fludarabina analizzate con anti-BAG3.

Fig. 2 – Modulazione negativa dei livelli proteici di BAG3 per mezzo di oligonucleotidi antisenso. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per 20 ore senza (b) o con gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 (b+α) o nonsenso di controllo (b+v) (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate ed analizzate in immunofluorescenza indiretta con un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il peptide sintetico NPSSMTDTPGNPAAP<sub>COOH</sub>, corrispondente agli ultimi 15 aminoacidi della regione carbossiterminale della proteina BAG3. a= anticorpo di controllo.

Fig. 3 – Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sul rilascio del citocromo c mitocondriale nelle cellule di B-CLL. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per i tempi indicati con o senza gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi sono stati ottenuti estratti cellulari ed il rilascio del citocromo c mitocondriale è stato analizzato come descritto nella ref. 8.

Fig. 4 - Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sull' attività di caspasi 3 nelle cellule di B-CLL. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per i tempi indicati con o senza gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi sono stati ottenuti estratti cellulari e l' attività di caspasi 3 è stata analizzata come descritto nella ref. 9.

Fig. 5 - Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sul legame all' annessina V nelle cellule di B-CLL. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per 40 ore con o

senza gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi la vitalità delle cellule è stata valutata attraverso incorporazione di ioduro di propidio nelle cellule non permeabilizzate, mentre contemporaneamente il legame all' annessina V è stato valutato attraverso immunofluorescenza, come descritto nella ref. 10.

Fig. 6 – Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sull' apoptosi in 15 campioni di B-CLL. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per cinque giorni con o senza fludarabina fosfato (2 microgr/ml) e/o gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo (13). Quindi le cellule sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

Fig. 7 – Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sull' apoptosi in cellule primarie da pazienti affetti da ALL. Le cellule leucemiche sono state isolate da campioni di sangue periferico di pazienti di B-CLL attraverso centrifugazione su Ficoll-Hypaque e tenute in coltura per quattro giorni (pannello B) o per i tempi indicati (pannello B) con o senza citosina arabinoside (1 microM) e/o gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisenso per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

Tabella 1 - Effetto degli oligonucleotidi antisenso per BAG3 sull' apoptosi in cellule della linea di osteosarcoma umano SAOS.

Oligo	Incubazione		
	Mezzo di controllo	Etoposide (5 microM)	Topotecan (40 ng/ml)
-	17.74*	38.32	36.84

BAG3 antisense	52.38	73.40	68.62
nonsense di controllo	25.84	45.40	41.60

\* % di apoptosi

Cellule della linea SAOS sono state incubate per 72 ore in 10% FCS-RPMI, con o senza chemioterapici (etoposide o topotecan) e/o gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisense per BAG3 o nonsense di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

Fig. 8 – Effetto degli oligonucleotidi antisense per BAG3 sui livelli di proteina BAG3 in cellule della linea mieloide umana U937 Cellule della linea U937 sono state incubate per un giorno in 10% FCS-RPMI con o senza gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisense per BAG3 o nonsense di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate ed analizzate in immunofluorescenza indiretta con un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il peptide sintetico NPSSMTDTPGNPAAP<sub>COOH</sub>, corrispondente agli ultimi 15 aminoacidi della regione carbossiterminale della proteina BAG3.

Fig. 9 - Effetto degli oligonucleotidi antisense per BAG3 sull'apoptosi indotta da stress in cellule U937. Cellule della linea U937 sono state incubate in triplicato per 40 ore con o senza dietilmaleato (DEM, 1.2 microM) e/o gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisense per BAG3 o nonsense di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

Fig. 10 - Effetto degli oligonucleotidi antisense per BAG3 sull'apoptosi indotta da stress in leucociti primari normali da sangue periferico. Da

campioni di sangue periferico umano normale sono stati ottenuti linfociti (pannello A) e monociti (pannello B) attraverso centrifugazione su gradiente di densità di Ficoll- Hypaque 50-72%; le cellule sono state incubate 48 ore in 10% FCS-RPMI con o senza una combinazione di DEM (1.2 microM) + 2ME (20 microM) e/o gli oligodeossinucleotidi fosforotioati antisense per BAG3 o nonsenso di controllo (5 microM) indicati nel testo. Quindi le cellule sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

**Tabella 2 - Effetto protettivo dell' iperespressione di BAG3 sull' apoptosi indotta da stress in cellule umane della linea 293**

Costrutto trasfettato	incubazione	% di apoptosi
PcDNA di controllo	mezzo di controllo	6.1±0.3*
	DEM+2ME	32.4±1.2
BAG3-pcDNA	mezzo di controllo	5.3±0.2
	DEM+2ME	13.4±0.5

\* media di duplicati ± SD

Cellule della linea umana sono state trasfettate usando una preparazione Eugene (Roche) con un costrutto di pcDNA di controllo oppure iperesprimente BAG3. L' iperespressione della proteina BAG3 è stata controllata per immunofluorescenza. Le cellule sono state incubate per 48 ore con o senza DEM+2ME, quindi sono state permeabilizzate, è stato aggiunto ioduro di propidio e la percentuale di elementi ipodiploidi è stata valutata in citofluorimetria come descritto nella ref. 11.

Riferimenti bibliografici

1. Nicholson DW. 2000. From bench to clinic with apoptosis- based therapeutic agents. *Nature* 407: 810.
2. Takayama S and Reed JC. 2001. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nature Cell Biology* 3: E237.
3. Takayama T, Xie Z, and Reed JC. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 274: 781.
4. Doong H, Price J, Kim Y-S, Gasbarre C, Probst J, Liotta LA, Blanchette J, Rizzo K, and Khon E. 2000. CAIR-1/BAG-3 forms and EGF- regulated ternary complex with phospholipase C gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene* 19: 4385.
5. Lee J-H, Takahashi T, Yasuhara N, Inazawa J, Kamada S, Tsujimoto Y. 1999. Bis, a Bcl-2- binding protein that synergize with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* 18: 6183.
6. Liao O, Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, Takayama S, Reed JC, Kleeff J, Buchler MW. 2001. The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 503:151.
7. Antoku K, Maser RS, Scully WJ Jr, Delach SM, and Johnson DE. 2001. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and Suppressor of Death Domains protein. *Biochem Biophys Res Comm* 286: 1003.
8. Renz A, Berdel WE, Kreuter M, Belka C, Schulze-Osthoff K, Los M. 2001. Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. *Blood* 98:1542.
9. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR and Newmeyer DD. 1997. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 16: 4639.
10. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84:1415.



11. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi CA. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271.
12. Tassone P, Tuccillo F, Bonelli P, Turco MC, Cecco L, Cerra M, Bond HM, Barbieri V, Venuta S. 1998. CD36 is rapidly and transiently upregulated on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocytes. Analysis by a new monoclonal antibody (UN7). *Tissue Antigens* 51: 671.
13. Romano MF, Lamberti A, Tassone P, Alfinito F, Costantini S, Chiurazzi F, DeFrance T, Bonelli P, Tuccillo F, Turco MC, Venuta S. 1998. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B-CLL cells. *Blood* 92: 990.

**RIVENDICAZIONI**

1. Polinucleotide isolato da usare come medicamento comprendente:  
una sequenza nucleotidica che codifica per un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica SEQ. ID. N. 2 o le sequenze SEQ. ID. 11, 13, 15, e relativi frammenti, o la SEQ. ID. N. 3, la sequenza nucleotidica SEQ. ID. N. 1 o le sequenze SEQ. ID. 10, 12, 14, e relativi frammenti, la sequenza nucleotidica che comprende la sequenza che codifica la proteina matura.
2. Polinucleotide isolato che ibridizza per il complemento dei polinucleotidi della riv. 1 in condizioni di stringente ibridizzazione.
3. Polinucleotide isolato che comprende il complemento dei polinucleotidi della riv. 1.
4. Oligonucleotide antisense isolato da usare come medicamento indicato come SEQ. ID. N. 4-6 o suoi equivalenti funzionali.
5. Polinucleotide/i secondo le riv. 1-4 da usare per la modulazione dell'apoptosi in cellule primarie.
6. Polinucleotide/i secondo le riv. 1-4 da usare per il trattamento di una fra le seguenti affezioni: danni tissutali acuti o cronici, come ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, danni cerebrali o di altri tessuti in relazione a HIV, malattie muscolari scheletriche, rigetto di trapianti; malattie degenerative croniche come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre; malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di altro tipo che coinvolgano un' apoptosi eccessiva o deficitaria; riparo di tessuti o rimarginazione di ferite, trattamento di incisioni chirurgiche, ed ulcere, come ulcere gastriche o diabetiche.
7. Vettore comprendente il/i polinucleotide/i delle riv. 1 o 2.
8. Vettore di espressione comprendente il/i polinucleotide/i isolato/i delle riv. 1 o 2.
9. Cellula geneticamente modificata per contenere il/i polinucleotide/i delle riv. 1 o 2.

10. Cellula geneticamente modificata per contenere il/i polinucleotide/i delle riv. 1 o 2 in associazione operativa con una sequenza regolatrice che controlla l'espressione del polinucleotide in detta cellula.
11. Polipeptide isolato da usare come medicamento comprendente: la sequenza amminoacidica SEQ. ID. N. 2 o le sequenze SEQ. ID. 11, 13, 15, e relativi frammenti, il peptide SEQ. ID. N. 3.
12. Polipeptide secondo la riv. 11 da usare per la modulazione dell'apoptosi in cellule primarie.
13. Polipeptide secondo la riv. 11 da usare per il trattamento di una fra le seguenti affezioni: danni tissutali acuti o cronici, come ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, danni cerebrali o di altri tessuti in relazione a HIV, malattie muscolari scheletriche, rigetto di trapianti; malattie degenerative croniche come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre; malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di altro tipo che coinvolgano un' apoptosi eccessiva o deficitaria; riparo di tessuti o rimarginazione di ferite, trattamento di incisioni chirurgiche, ed ulcere, come ulcere gastriche o diabetiche.
14. Anticorpo diretto contro il polipeptide della riv. 11.
15. Composizioni farmaceutiche da usare come medicamento comprendenti almeno uno fra i componenti seguenti: sequenza amminoacidica SEQ. ID. N. 2 o almeno uno dei suoi frammenti ricavati dalla sequenza indicata mediante sottolineatura, sequenza nucleotidica SEQ. ID. N. 1 o le sequenze SEQ. ID. 11, 13, 15, e relativi frammenti, peptide SEQ. ID. N. 3, oligonucleotidi antisense SEQ. ID. N. 4-6, sequenze complementari a dette sequenze nucleotidiche o oligonucleotidi, anticorpo monoclonale o policlonale atto a riconoscere uno o più epitopi specifici di BAG3, vettori contenenti sequenze specifiche di BAG3, cellule ingegnerizzate per

contenere tali sequenze e cellule ingegnerizzate per esprimere tali sequenze

16. Composizioni secondo la riv. 15 comprendenti ulteriormente un carrier farmaceuticamente accettabile.
17. Composizioni secondo la riv. 15 per la modulazione dell'apoptosi in cellule primarie.
18. Composizioni secondo la riv. 15 da usare per il trattamento di una fra le seguenti affezioni: danni tissutali acuti o cronici, come ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, danni cerebrali o di altri tessuti in relazione a HIV, malattie muscolari scheletriche, rigetto di trapianti; malattie degenerative croniche come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre; malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di altro tipo che coinvolgano un' apoptosi eccessiva o deficitaria; riparo di tessuti o rimarginazione di ferite, trattamento di incisioni chirurgiche, ed ulcere, come ulcere gastriche o diabetiche.
19. Impiego del polinucleotide secondo le riv. 1-4 per la modulazione dell'apoptosi in cellule primarie.
20. Impiego del polipeptide secondo la riv. 14 per la modulazione dell'apoptosi in cellule primarie.
21. Impiego secondo le riv. 19 e 20 per il trattamento di una fra le seguenti affezioni: danni tissutali acuti o cronici, come ischemia cardiaca, renale, cerebrale o di altri organi, danni cerebrali o di altri tessuti in relazione a HIV, malattie muscolari scheletriche, rigetto di trapianti; malattie degenerative croniche come il Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica ed altre; malattie neoplastiche, autoimmunitarie o di altro tipo che coinvolgano un' apoptosi eccessiva o deficitaria; riparo di tessuti o rimarginazione di ferite, trattamento di incisioni chirurgiche, ed ulcere, come ulcere gastriche o diabetiche.

22. Metodo per rilevare la presenza della sequenza nucleotidica SEQ. ID. N. 1 o della proteina SEQ. ID. N. 2 o di parti di esse in un campione comprendente gli stadi di: mettere in contatto il campione con un composto che si lega a formare un complesso con il nucleotide o la proteina in condizioni sufficienti per formare il complesso e rilevare il complesso.
23. Metodo per identificare un composto che si lega al polipeptide SEQ. ID. N. 2 comprendente gli stadi di: mettere in contatto il composto con il polipeptide SEQ. ID. N. 2 in condizioni perché si formi il complesso composto/polipeptide e rilevare il complesso.
24. Kit di identificazione e diagnosi comprendente il polinucleotide secondo le riv. 1-4 o il polipeptide secondo la riv. 13 o gli oligo antisenso SEQ. ID. N. 4-6 o funzionalmente equivalenti.

LISTA DELLE SEQUENZE PER LA DOMANDA DI BREVETTO DAL  
TITOLO "Sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di BAG3 da  
impiegare in ricerca, diagnosi e terapia per patologie che coinvolgono la  
morte cellulare, e per la modulazione della sopravvivenza e/o morte  
cellulare."

Titolari: Arturo LEONE e Maria Caterina TURCO

Inventori: Arturo LEONE e Maria Caterina TURCO

SEQ. ID. N. 1:

1 gcgagctcc gcatccaacc ccgggcccgcg gccaaactttt  
ttggactgga ccagaagttt  
- ctagccggcc agttgctacc tccctttatc tcctccttcc  
cctctggcag cgaggaggct  
121 atttcagac acttcacccc ctctctggcc acgtcacccc  
cgcttttaat tcataaaggt  
181 gcccggcgcc ggcttcccgg acacgtcggc ggccgagagg  
ggcccacggc ggccggcccgg  
241 ccagagactc ggcgcccggga gccagcgccc cgcacccgcg  
ccccagcggg cagaccccaa  
301 cccagcatga gcgcccgcac ccactcgccc atgatgcagg  
tggcgtccgg caacggtag  
361 cgcgaccctt tgccccccgg atgggagatc aagatcgacc  
cgagaccgg ctggcccttc  
421 ttcgtggacc acaacagccg caccactacg tggaacgacc  
cgcgctgccc ctctgagggc  
481 cccaaggaga ctccatcctc tgccaatggc ccttcccggg  
agggtctag gctgcgcct  
541 gctaggggaag gccaccctgt gtacccccag ctccgaccag  
gctacattcc cattcctgtg  
601 ctccatgaag gcgctgagaa ccggcagggtg caccctttcc  
atgtctatcc ccagcctggg  
661 atgcagcgat tccgaactga ggccggcagca gcggctcctc  
agaggtccca gtcacctctg  
721 cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg  
gacagggtggc agcggcggcg  
781 gcagcccagc cccagcctc ccacggacct gagcgggtccc  
agtctccagc tgcccttgac  
841 tgctcatcct catcctcctc ggccagcctg ccttcctccg  
gcaggagcag cctgggcagt  
901 caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac  
acgagcagaa cgttacccgg  
961 ccagcagccc agccctcctt ccaccaagcc cagaagacgc  
actaccagc gcagcagggg

1021 gagtaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg  
gggatgactg ggagccccgg  
 1081 cccctgcggg cggcatcccc gttcaggtca tctgtccagg  
gtgcatcgag ccgggagggc  
 1141 tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctcgc  
ccatccgtgt gcacaccgtg  
 1202 gtcgacaggc ctcagcagcc catgacccat cgagaaactg  
cacctgtttc ccagcctgaa  
 1261 aacaaaccag aaagtaagcc aggcccagtt ggaccagaac  
tccctcctgg acacatccca  
 1322 attcaagtga tccgcaaaga ggtggattct aaacctgttt  
cccagaagcc cccacctccc  
tctgagaagg tagaggtgaa agttccccct gctccagttc  
cttgtcctcc tcccagccct  
 1441 ggcccttctg ctgtcccctc tcccccaag agtgtggcta  
cagaagagag ggcagccccc  
 1502 agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca aaaccaggag  
aagccgaggg tcccccaaaa  
 1562 catccaggag tgctgaaagt ggaagccatc ctggagaagg  
tgcaggggct ggagcaggct  
 1621 gtagacaact ttgaaggcaa gaagactgac aaaaagtacc  
tgatgatcga agagtatttg  
 1681 accaaagagc tgctggccct ggattcagtg gaccccgagg  
gacgagccga tgtgcgtcag  
 1742 gccaggagag acggtgtcag gaaggttcag accatcttgg  
aaaaacttga acagaaagcc  
 1801 attgatgtcc caggtcaagt ccaggtctat gaactccagc  
ccagcaacct tgaagcagat  
 1861 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag  
cagacaaggg caagaaaaat  
 1922 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc  
cagaagccac agcagcagcg  
 1981 acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc  
cagcagcacc gtagcctctg  
 2041 ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgctttagg  
gaattttaag ttgcatgcat  
 2101 ttcagagact ttaagtcagt tggtttttat tagctgcttg  
gtatgcagta acttgggtgg  
 2161 aggcaaaaca ctaataaaaag ggctaaaaag gaaaatgatg  
cttttcttct atattcttac  
 2222 tctgtacaaa taaagaagtt gcttgttggt tcagaagttt  
aaccccgttg cttgttctgc  
 2282 agccctgtct acttgggcac ccccaccacc tgtagctgt  
ggttggtgcac tgtcttttgt  
 2341 agctctggac tggaggggta gatggggagt caattaccca  
tcacataaat atgaacatt

2402 tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca  
tctcataatt aaaatacctg  
 2461 acttttagaga gagtaaaatg tgccaggagc cataggaata  
tctgtatggtt ggatgacttt  
 2521 aatgctacat ttt

## SEQ. ID. N. 2:

"MSAATHSPMMQVASNGDRDPLPPGWEIKIDPQTGWPFVVDHNS

RTTTWNDPRVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPI  
VLHEG

AENRQVHPFHVYPQPGMQRFERTEAAAAAPQRSQSPLRGMPETTQPDKQCGQVA  
AAAAA

QPPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPSSGRSSLGSHQLPRGYISIPVIHE  
QNVTR

PAAQPSFHQAQKTHYPAQQGEYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRSSVQ  
GASSR

EGSPARSSTPLHSPSPIRVHTVVDPRQOPMTHRETAPVSQPENKPESKPGPVG  
PELPP

GHIPIQVIRKEVDSKPVVSQKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPSAVPSSP  
KSVAT

EERAAPSTAPAEATPPKPGAEAPPKHGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEGK  
KTDKK

YLMIEEYLTKEALLDSVDPEGRADVRRQARRDGVKVKQTILEKLEQKAIDVPG  
QVQVY

ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEATAAATSN  
PSSMT

DTPGNPAAP"

SEQ. ID. N. 3: NPSSMTDTPGNPAAP

SEQ. ID. N. 4: TGCATCATGG GCGAGTGGGT GGCGG

SEQ. ID. N. 5: GCTCATGCTG GGTTGGGGTC TG

SEQ. ID. N. 6: ATTAAAGGCG GGGGTGACGT GG

SEQ. ID. N. 7: TTATATTCTATTATATTTATGAACTCC

SEQ. ID. N. 8: CCTCGTAACCACCG ACCTCAAT

SEQ. ID. N. 9: GCTTATGGAG GATTGAGGTT GG



## SEQ. ID. N. 10:

gcgagctcc gcatccaacc ccgggcccgc gccaaacttt ttgactgga ccagaagttt  
ctagccggcc agttgctacc tccctttatc tctccttcc cctctggcag cgaggaggct  
attccagac acttccaccc ctctctggcc acgtcacccc cgcctttaat tcataaaggt  
gcccggcggc ggcttcccg acacgtcggc ggaggagagg ggcccacggc  
ggcgccccgg ccagagactc ggcgccccga gccagcggcc cgcacccggc  
cccagcggg cagaccccaa ccagcatga gcgcggccac ccactcgccc atgatgcagg  
tggcgtccgg caacggtgac

## SEQ. ID. N. 11:

MSAATHSPMMQVASGNGDRDPLPPGWEIKIDPQTG

## SEQ. ID. N. 12:

gtgcc ctctgagggc cccaaggaga ctccatcctc tgccaatggc ccttccggg agggctctag  
gtgcccgt gctagggag gccacccgt gtacccccag ctccgaccag gctacattcc  
cattctgtg ctcatgaag gcgctgagaa ccggcagggt cacccttcc atgtctatcc  
ccagcctggg atgcagcgt tccgaactga ggcggcagca gcggctcctc agaggtccca  
gtcacctctg cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg gacaggtggc  
agcgggcggc gcagcccagc cccagcctc ccacggacct gagcgggtccc agtctccagc  
tgcctctgac tgcctatcct catcctcctc ggccagcctg ccttctcgg gcaggagcag  
cctgggcagt caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac acgagcagaa  
cgttaccgg ccagcagccc agccctcctt ccaccaagcc cagaagacgc actaccagc  
gcagcagggg gactaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg gggatgactg  
ggagccccgg cccctgcggg cggcatcccc gtccaggtca tctgtccagg gtgcacgcag  
ccgggagggc tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctgc ccatccgtg  
gcacaccgtg gtgcacaggc ctacgcagcc catgacctat cgagaaactg cactgtttc  
ccagcctgaa aacaaaccag aaagtaagcc aggccagtt ggaccagaac tccctcctg  
acacatccca attcaagtga tccgcaaaga ggtggattct aaacctgtt cccagaagcc  
cccacctccc tctgagaagg tagaggtgaa agttccccct gctccagttc cttgtcctc  
tcccagccct ggccctctg ctgtccctc tcccccaag agtgtggcta cagaagagag  
ggcagcccc agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca aaaccaggag aagccgaggg  
tccccaaaa catccaggag

## SEQ. ID. N. 13:

NDPRVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPI  
VLHEGAENRQVHPFHVYPQPGMQRFRTEAAAAAPQRSQSPLRGMPE  
TTQPDKQCGQVAAAAAAPPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPS  
SGRSSLGSHQLPRGYISIPVIHEQNVTRPAAQPSFHQAQKTHYPAQQG  
EYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRSSVQGASSREGSPARSST  
PLHSPSPIRVHTVDRPQQPMTHRETAPVSQPENKPESKPGPVGPEL  
PPGHIPIQVIRKEVDSKPVVSQKPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPS  
AVPSSPKSVATEERAAPSTAPAEATPPKPGAEAPPKHPGVLKVEAILE  
KVQGLEQAVDNFEG

## SEQ. ID. N. 14

attgatgtcc cagggtcaagt ccagggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat  
cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat  
gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac  
agcagcagcg acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc cagcagcacc  
gtagcctctg ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgctttagg gaattttaag  
ttgcatgcat ttacagagact ttaagtcagt tggttttat tagctgctg gtatgcagta acttgggtgg  
aggcaaaaca ctaataaaaag ggctaaaaag gaaaatgatg ctttcttct atattcttac  
tctgtacaaa taaagaagtt gcttggtgtt tcagaagttt  
aaccocgttg cttggtctgc  
agccctgtct acttggggcac ccccaccacc tgtagctgt  
ggttgtgcac tgtcttttgt  
agctctggac tggaggggta gatggggagt caattacca  
tcacataaat atgaaacatt  
tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca  
tctcataatt aaaatacctg  
actttagaga gagtaaaatg tgccaggagc cataggaata  
tctgtatgtt ggatgacttt  
aatgctacat ttt

SEQ. ID. N. 15:

ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEAT  
AAATSNPSSMTDTPGNPAAP

**RIASSUNTO**

La presente invenzione si riferisce a sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di BAG3 da impiegare in terapia, diagnosi e ricerca nel campo della modulazione della sopravvivenza e/o morte di cellule primarie, in particolare nelle leucemie ed altre neoplasie o malattie che coinvolgano la morte cellulare.

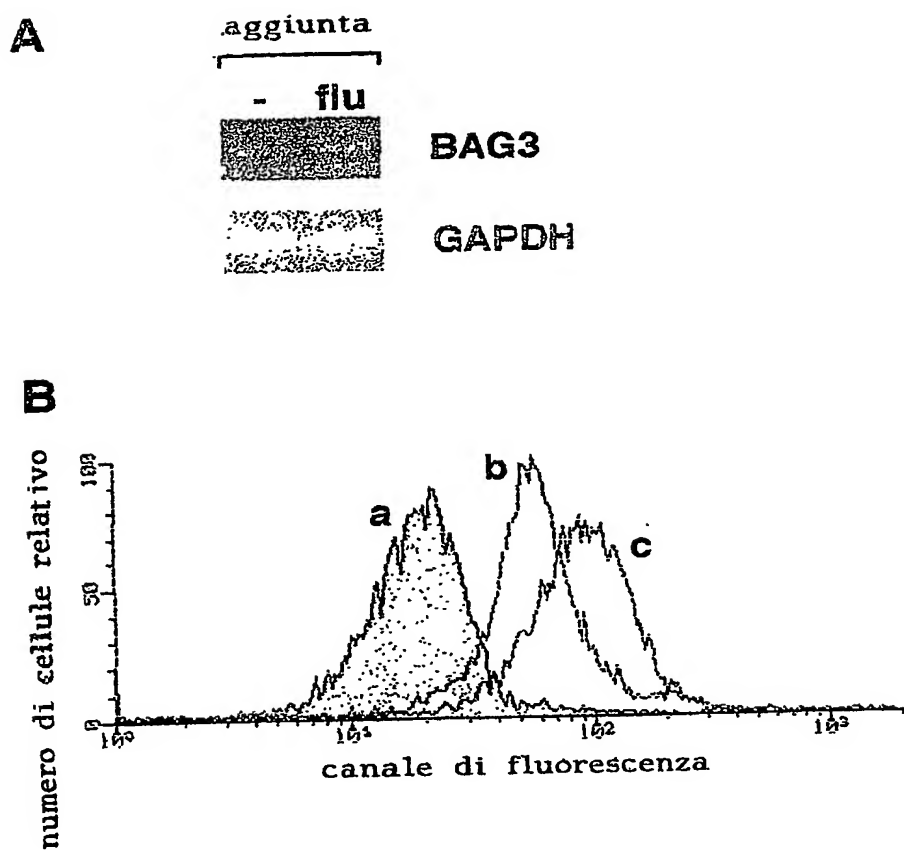


Fig. 1

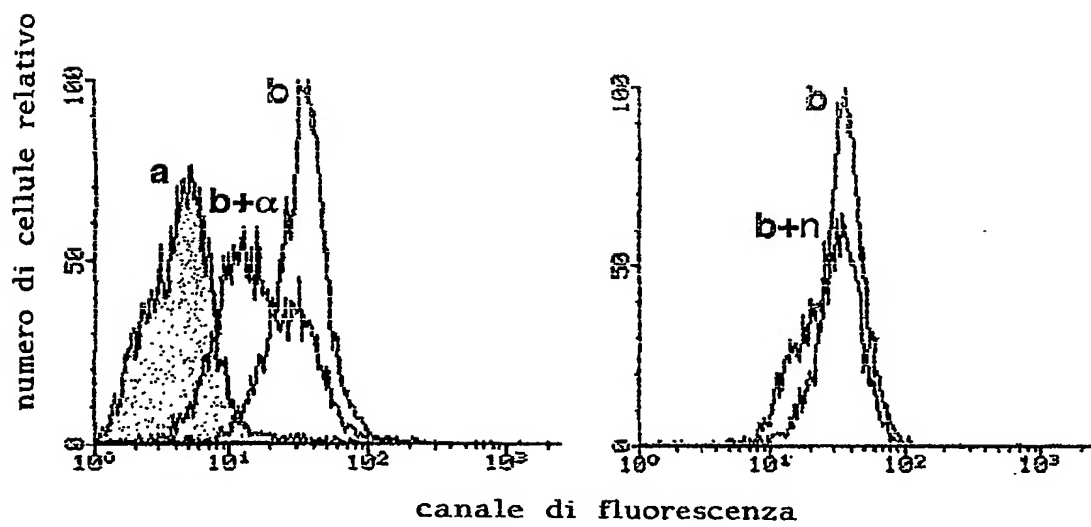


Fig. 2

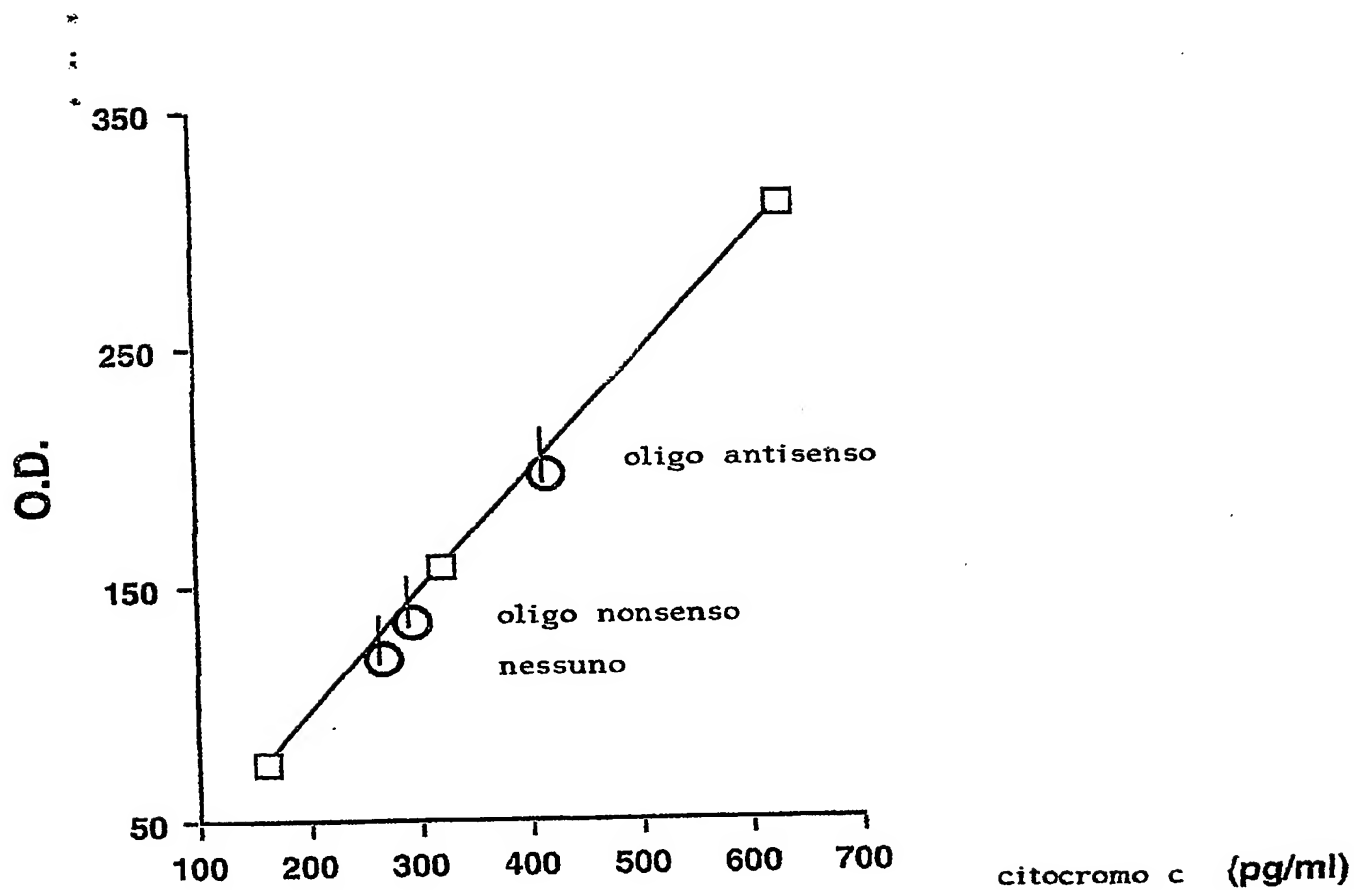


Fig. 3

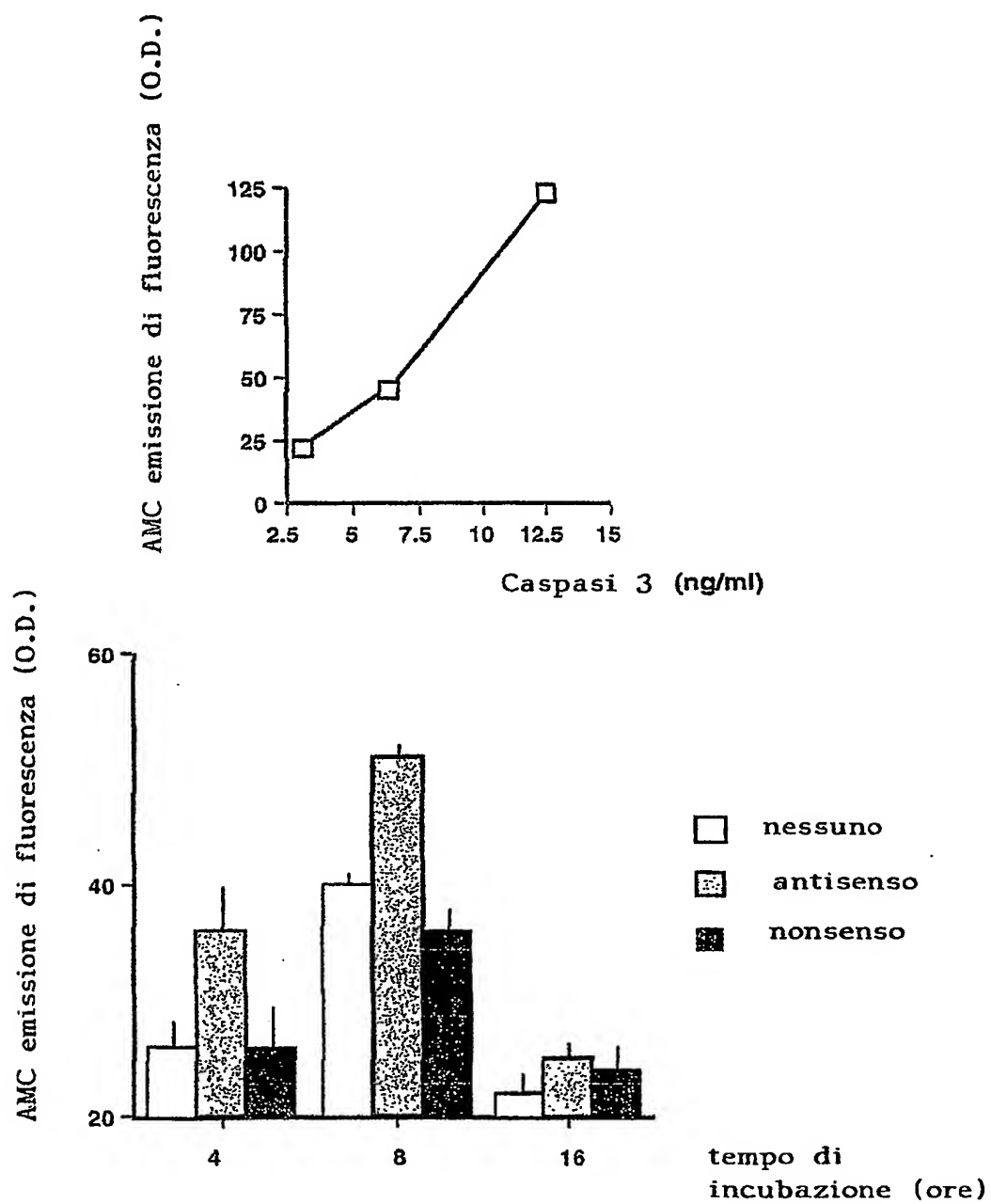


Fig. 4

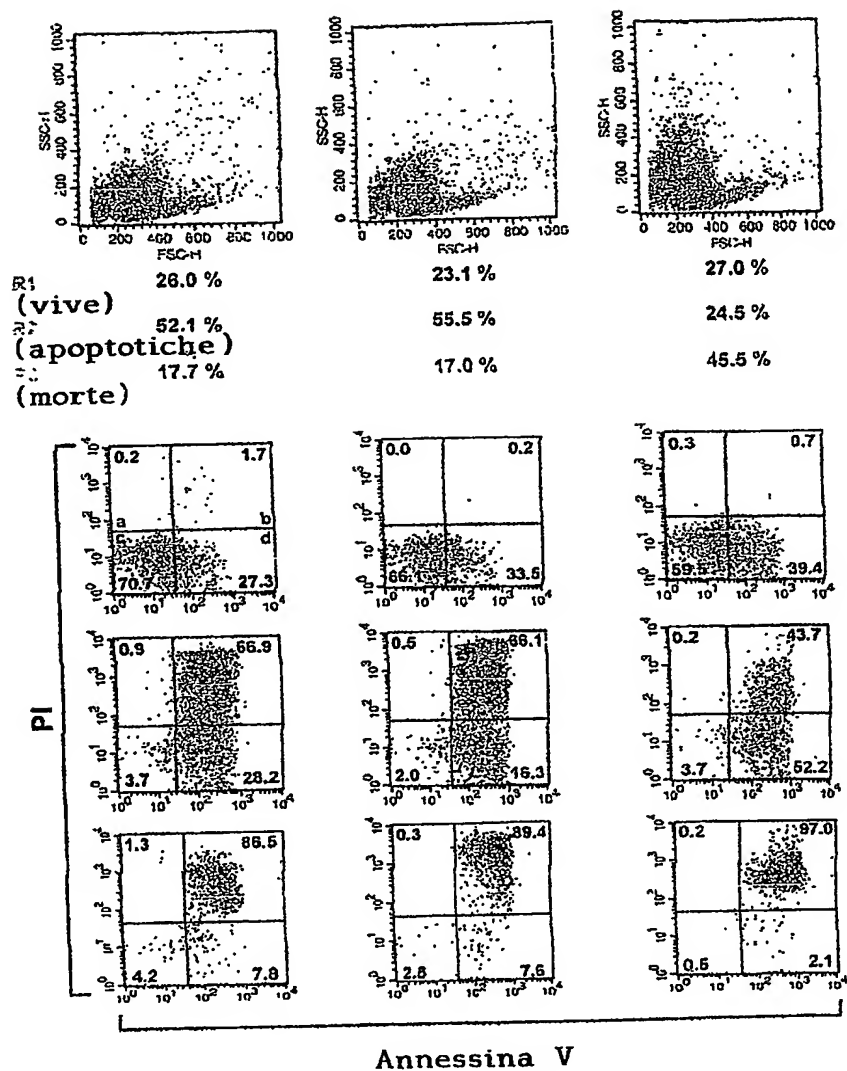


Fig. 5



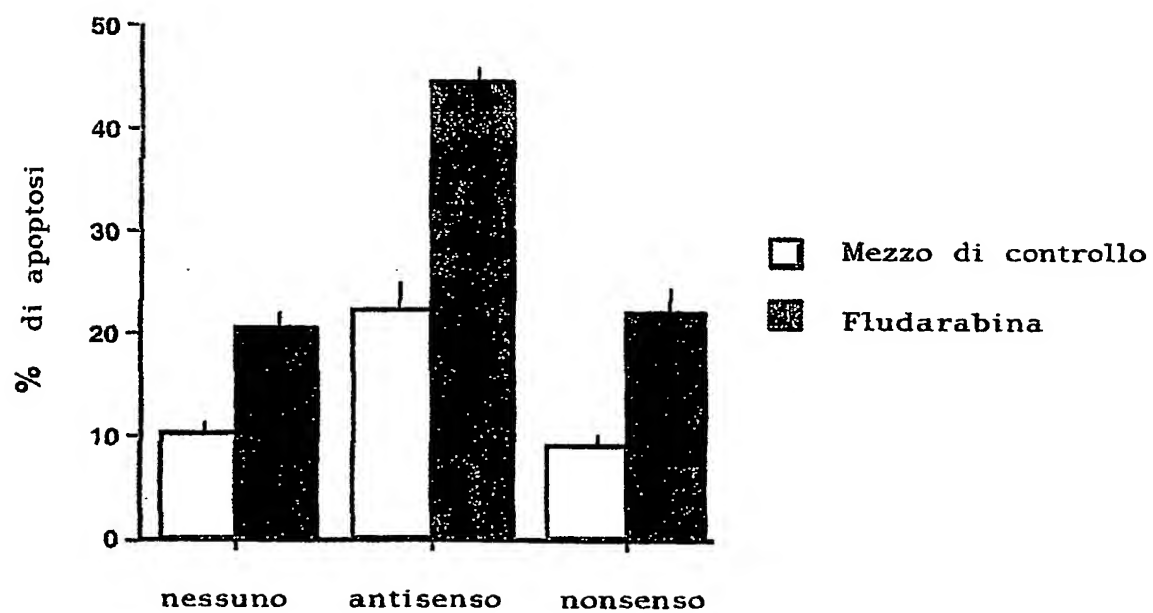


Fig. 6

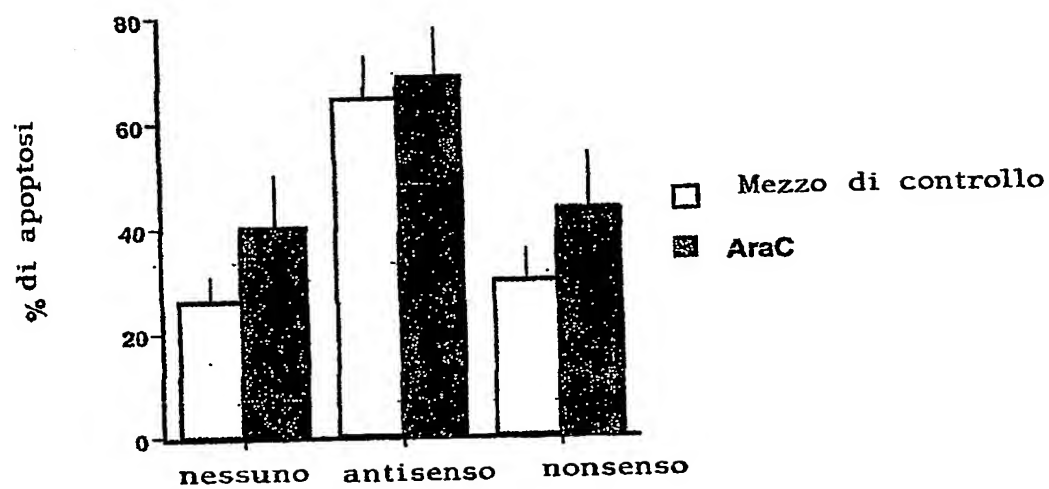
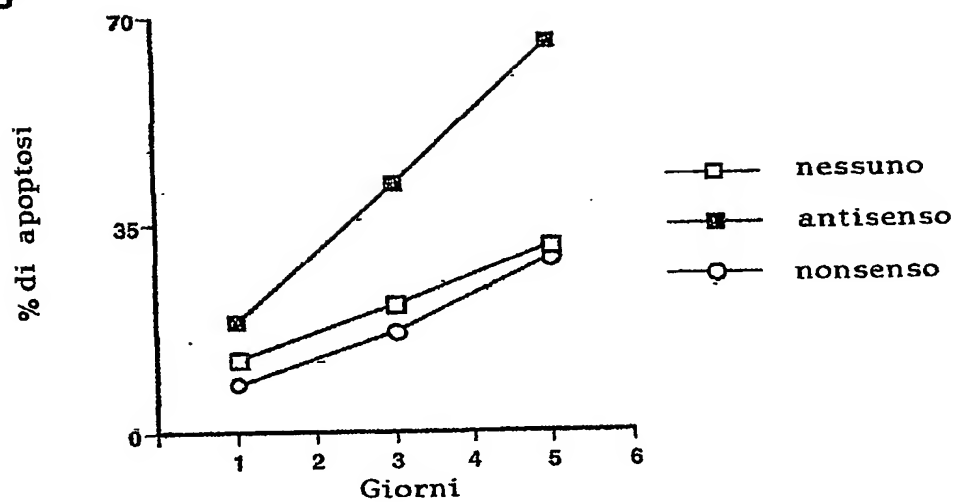
**A****B**

Fig. 7

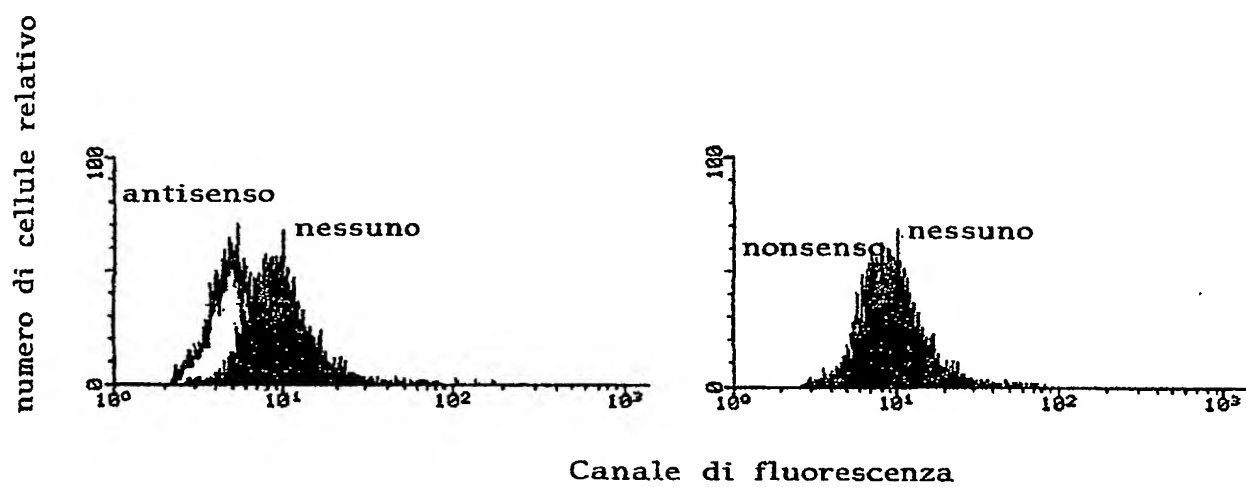


Fig. 8

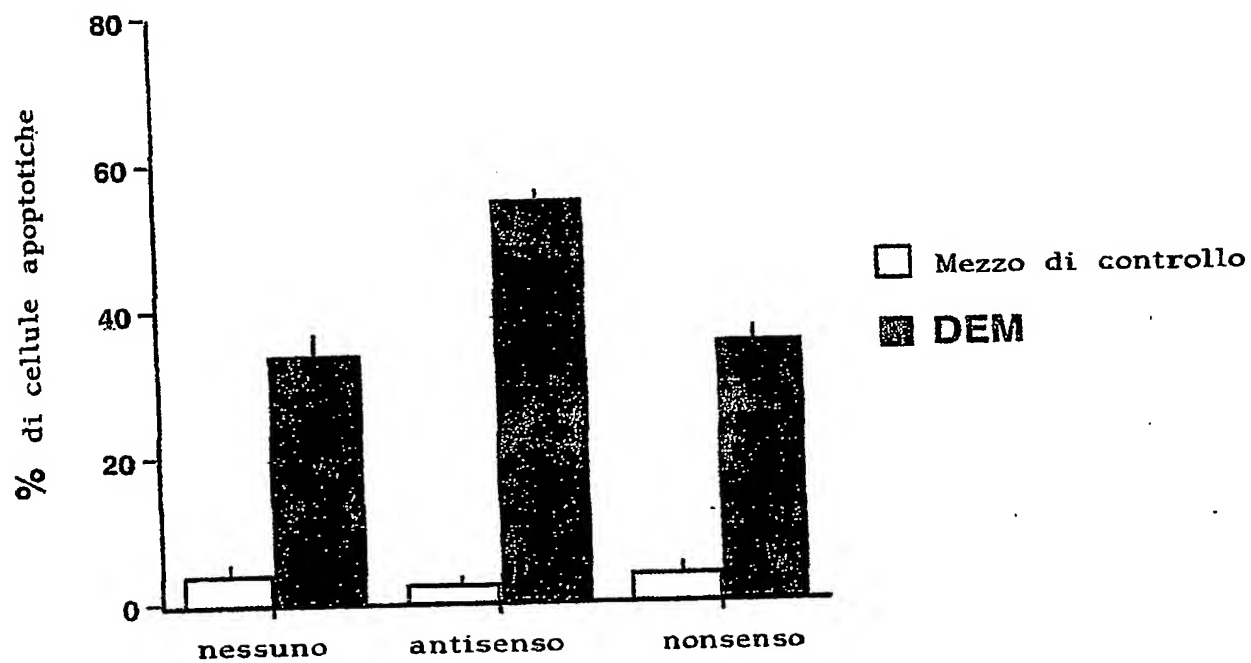


Fig. 9

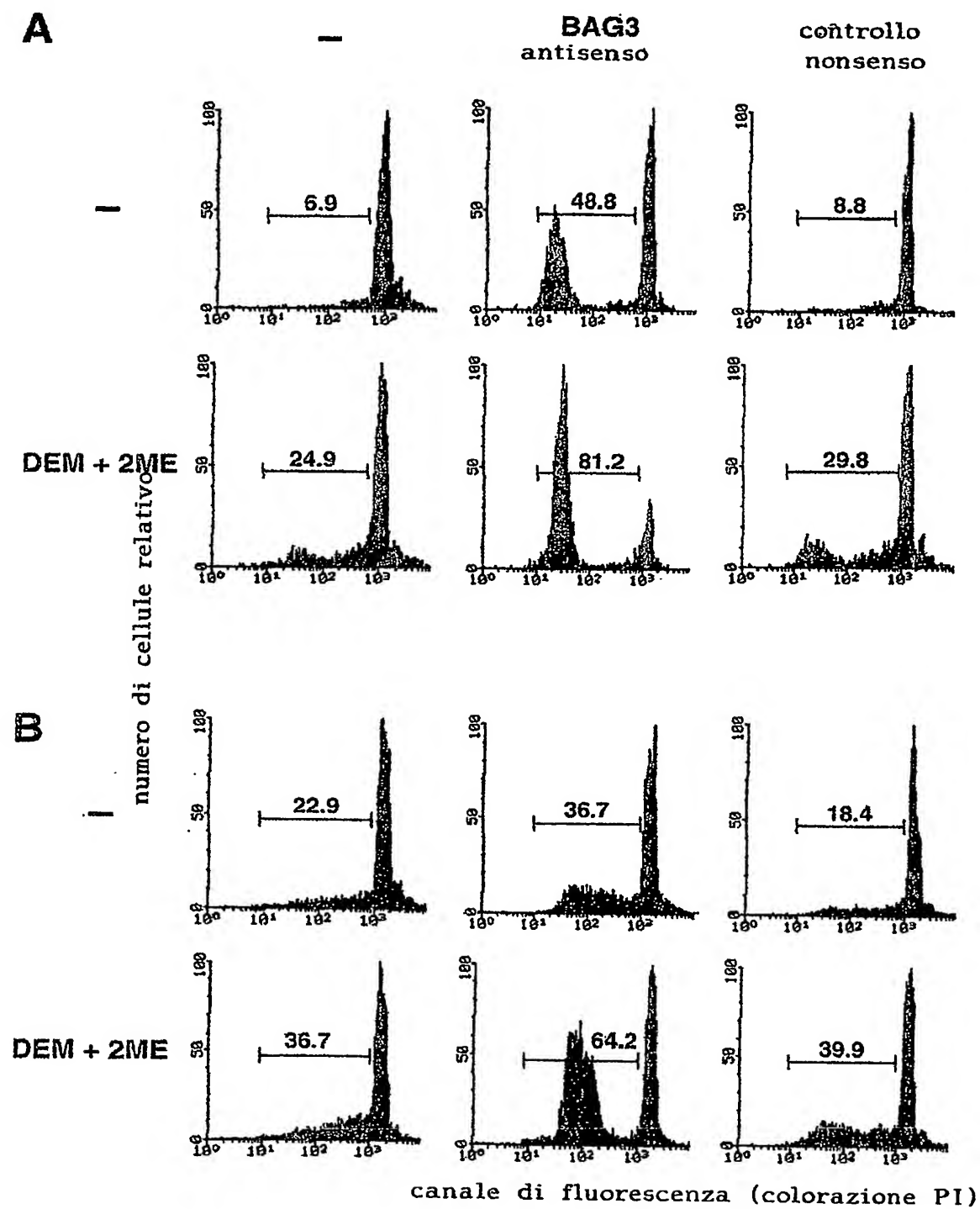


Fig. 10